

10 / 830 69

PCT/JP03/12711

04 APR 2003

03.10.03

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

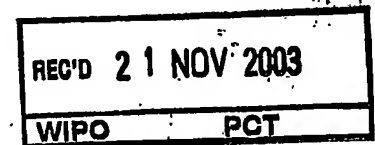
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2002年11月27日

出 願 番 号  
Application Number: 特願2002-344710  
[ST. 10/C]: [JP2002-344710]

出 願 人  
Applicant(s): 三菱ウェルファーマ株式会社

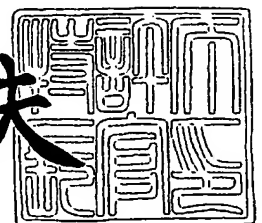


PRIORITY  
DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2003年11月 7日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 A5806

【提出日】 平成14年11月27日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 G01N 33/68

【発明者】

【住所又は居所】 東京都中央区日本橋本町二丁目2番6号 三菱ウェルファーマ株式会社 東京本社内

【氏名】 田中 憲次

【発明者】

【住所又は居所】 東京都中央区日本橋本町二丁目2番6号 三菱ウェルファーマ株式会社 東京本社内

【氏名】 李 良子

【発明者】

【住所又は居所】 東京都中央区日本橋本町二丁目2番6号 三菱ウェルファーマ株式会社 東京本社内

【氏名】 棟近 公司

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市保土ヶ谷区神戸町134 横浜ビジネスパークH i - t e c hセンター1F 住商バイオサイエンス株式会社横浜研究所内

【氏名】 有國 尚

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市保土ヶ谷区神戸町134 横浜ビジネスパークH i - t e c hセンター1F 住商バイオサイエンス株式会社横浜研究所内

【氏名】 落合 文吾

【特許出願人】

【識別番号】 000006725

【氏名又は名称】 三菱ウェルファーマ株式会社

【代理人】

【識別番号】 100080791

【弁理士】

【氏名又は名称】 高島 一

【電話番号】 06-6227-1156

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 006965

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0006921

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 質量分析用プレート、その調製方法およびその用途

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 支持体上にポリビニリデンジフロリドの堆積した薄層を有してなる質量分析用プレート。

【請求項 2】 支持体がアルミニウムまたはステンレス・スチールである請求項 1 記載の質量分析用プレート。

【請求項 3】 ポリビニリデンジフロリドで支持体をコーティングすることを特徴とする質量分析用プレートの調製方法。

【請求項 4】 コーティング手段が塗布、噴霧、蒸着、浸漬、印刷またはスパッタリングである請求項 3 記載の方法。

【請求項 5】 ポリビニリデンジフロリド含有溶液を支持体にアプライすることを特徴とする請求項 3 または 4 記載の方法。

【請求項 6】 アプライ後に溶媒を除去することを含む請求項 5 記載の方法。

【請求項 7】 請求項 3 ～ 6 のいずれかに記載の方法により得られる質量分析用プレート。

【請求項 8】 蛋白質含有試料を電気泳動して蛋白質を分離し、分離した蛋白質を請求項 1 または 7 記載の質量分析用プレートに転写し、転写された蛋白質を質量分析することを特徴とする蛋白質の同定方法。

【請求項 9】 転写が電気転写である請求項 8 記載の方法。

【請求項 10】 質量分析がMALDIの態様である請求項 8 または 9 記載の方法。

【請求項 11】 蛋白質含有試料が複数種の蛋白質を含有する、請求項 8 ～ 10 のいずれかに記載の方法。

【請求項 12】 転写後の質量分析用プレートに、転写された蛋白質と親和性を有する物質を含有する試料を添加して該プレート上で複合体を形成させ、該複合体を質量分析することにより該親和性を有する物質を同時に同定することを特徴とする、請求項 8 ～ 11 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 3】 転写後または複合体形成後、さらに質量分析用マトリックスをプレートに添加することを特徴とする、請求項 8 ～ 1 2 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 4】 マトリックスが 2, 5 - ジヒドロキシ安息香酸である請求項 1 3 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、プロテオーム解析を多量、迅速、かつ高感度を実施できる、新規な質量分析用プレート、その調製方法およびその用途に関する。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

分子生物学やゲノミクス（ゲノム科学）をはじめとする創薬の基盤研究の進歩により、ここ数年間で創薬の様相が急速に変化し、ゲノム創薬に代表される新しい創薬方法が開発されつつある。

しかしながら、ゲノミクスが明らかにした塩基配列からはまだ蛋白質の機能（生理作用）は予測できず、遺伝情報を新薬に結び付ける手法の確立がポストゲノムに求められている。その一つとして、上述の塩基配列から翻訳される蛋白質（10万種以上とも言われる）を全て単離・同定し、その機能を帰属することを目的とするプロテオミクス（蛋白質解析科学）が注目を浴びている。

【0 0 0 3】

プロテオームとは、広義には一個の生物体を構成する全ての蛋白質を意味するが、狭義にはある細胞の細胞液中の全蛋白質、血清中に含まれる全ての蛋白質、ある組織に含まれる全ての蛋白質等のように、生物体の組織学的、解剖学的に特定される部位に含まれる全ての蛋白質を意味する場合もある。本明細書では、狭義の意味で使用しているが、狭義のプロテオームの完全な集合体が広義のプロテオームであることは明らかである。

【0 0 0 4】

プロテオーム解析では、従来より二次元電気泳動法と質量分析法を組合わせる

方法が汎用されてきたが、以下の問題点が未だ解決されずにいる。すなわち、従来法では、泳動後の試料を質量分析法にかけるとともに、泳動ゲルを小片に分断し、特殊な溶液でそれぞれの小片から蛋白質を抽出しなければならない。このように長時間を消費し、多段階の煩雑な操作が要求されるために、測定時間の短縮化、装置の小型化、大量検体の処理、全装置のロボット化が極めて困難であった。

#### 【0 0 0 5】

さらに、いわゆる「多数の微量蛋白質」(low-abundance proteins)の問題がある。例えば、酵母では、たった100個の遺伝子が酵母の全蛋白質重量の50%を製造している。これは、残り50%の蛋白質が何千もの遺伝子の産物であることを意味する。大量の微量蛋白質には、調節蛋白質、受容体を含めた情報伝達蛋白質等、生体にとって最も重要な蛋白質が大量に含まれる。しかしながら、従来法では電気泳動により分離した多数かつ微量の蛋白質試料を回収することが不可能な状況にある。

#### 【0 0 0 6】

このような電気泳動法と質量分析法の組合せ技術の限界を解決し、かつ蛋白質-蛋白質相互作用を解明すべく、現在様々な取り組みが行われている。例えば、同位体標識化アフィニティタグ法(ICAT: isotope-coded affinity tag、非特許文献1)、酵母でのtwo-hybrid system、BIA-MS-MS、蛋白質アレイ法(溶液、チップ、非特許文献2)、LC-MS-MSによるペプチドミクス等である。このうち、蛋白質アレイ法としては、固相蛋白質アレイ法(チップ法、非特許文献3)、ナノ粒子に情報を組み込んだ液相アレイ法(fluorescence-encoded beads; 非特許文献4、5; barcoded nanoparticles、前記非特許文献2)などが挙げられる。

#### 【0 0 0 7】

一方、本発明者らは、膜蛋白質と当該蛋白質と相互作用可能な化合物とを各々グループ化し、両者を同時分析することが可能なプロテオーム解析法を提案している(特許文献1)。

#### 【0 0 0 8】

このような測定方法(システム)の改良とは別に、プロテオーム解析を目的としないか、あるいは技術的にプロテオーム解析への使用は困難であるが、蛋白質

の質量分析分野での改善を目指した幾つかの報告がある。電気泳動により分離した蛋白質をポリビニリデンジフロリド (polyvinylidene difluoride; P V D F) 膜に転写して、MALDI型質量分析用のステンレス製プレートに両面テープ (非特許文献6)、フレーム (非特許文献7) あるいはグリース (非特許文献8、9 および特許文献2) で固定化して測定する方法が報告されている。これらの方法は、一旦 P V D F 膜を測定途中で質量分析用プレートに固定化する点で操作が煩雑となるだけでなく、バックグラウンドが高く、相対ピーク強度が極端に低いという欠点があり、高い検出感度が求められるプロテオーム解析には不向きである。

#### 【 0 0 0 9 】

また、予めマトリックスを塗布した質量分析用プレートに電気泳動後のゲルを直接転写させて質量分析する方法や、一旦プロット用の P V D F 膜に蛋白質を電気転写した後に、予めマトリックスを塗布した質量分析用プレートに拡散転写する方法も報告されている (特許文献3)。しかしながら、これらの方法においては、電気転写を用いた場合、マトリックスが転写中に転写緩衝液中に溶出して測定自体が不可能になる恐れがある。一方、拡散転写を用いた場合は転写効率が低いため、特に微量蛋白質を質量分析用プレートに転写するには検出感度の面から不十分である。

さらに上記の技術を改良して、マトリックスにニトロセルロース (プロット用の膜成分である) を混合して質量分析用プレートに塗布する方法が報告されている (特許文献4)。しかし、この方法でも電気転写、拡散転写のいずれの場合における問題点も完全に解決されたとはいえない。

#### 【 0 0 1 0 】

ところで、質量分析用プレートとしては、通常用いられるアルミニウムあるいはステンレス・スチール製プレートの他に、これらを改良し、シリカでコートした、あるいは、疎水性基を付加した質量分析用プレート等も市販されている (CiphaGen社製、特許文献5)。しかし、これらの技術・製品も、大量、迅速かつ高感度にプロテオーム解析を行うという研究開発のニーズを必ずしも満たすものではない。

## 【0011】

## 【特許文献1】

国際公開第02/56026号パンフレット

## 【特許文献2】

国際公開第00/45168号パンフレット

## 【特許文献3】

米国特許第5595636号明細書

## 【特許文献4】

英国特許出願公開第2312782号明細書

## 【特許文献5】

特表平9-501489号公報

## 【非特許文献1】

ネイチャー・バイオテクノロジー (Nat. Biotech.) , 米国, 1999年, 第17巻, p. 994-999

## 【非特許文献2】

トレンドズ・イン・バイオテクノロジー (Trends Biotechnol.) , 英国, 2001年, 第19巻, p. S34-39

## 【非特許文献3】

カレント・オピニオン・イン・バイオテクノロジー (Curr. Opin. Biotechnol.) , 英国, 2001年, 第12巻, p. 65-69

## 【非特許文献4】

クリニカル・ケミストリー (Clin. Chem.) , 米国, 1997年, 第43巻, p. 1749-1756

## 【非特許文献5】

ネイチャー・バイオテクノロジー (Nat. Biotech.) , 米国, 2001年, 第19巻, p. 631-635

## 【非特許文献6】

エレクトロフォーレーシス (Electrophoresis) , 独国, 1996年, 第17巻, p. 954-961



## 【非特許文献 7】

アナリティカル・ケミストリー (Anal. Chem.) , 米国, 1997 年  
第 69 巻, p. 2888-2892

## 【非特許文献 8】

アナリティカル・ケミストリー (Anal. Chem.) , 米国, 1999 年  
第 71 巻, p. 4800-4807

## 【非特許文献 9】

アナリティカル・ケミストリー (Anal. Chem.) , 米国, 1999 年  
第 71 巻, p. 4981-4988

## 【0012】

## 【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、従来の電気泳動法と質量分析法の組合せ技術によるプロテオーム解析法に新しい技術を導入することにある。詳しくは、プロテオーム解析を多量、迅速かつ高感度を実施できる技術を提供することにある。

## 【0013】

## 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記の事情を考慮して、従来の質量分析用プレートを改良すべく鋭意研究を重ねた結果、P V D F でプレートをコーティングして該プレート上に P V D F の薄層を形成させた質量分析用プレートは、マトリックスを含まないので電気転写によっても溶出することなく、また、P V D F を膜の形態でプレートに固定化した場合に比べて、飛躍的に質量分析の検出感度および精度が向上することを見出し、本発明の完成するに至った。

## 【0014】

すなわち、本発明は、

- 1) 支持体上に P V D F の堆積した薄層を有してなる質量分析用プレート；
- 2) P V D F で支持体表面をコーティングすることを特徴とする質量分析用プレートの調製方法；
- 3) 蛋白質含有試料を電気泳動して蛋白質を分離し、分離した蛋白質を前記 1) の、もしくは前記 2) の方法により得られる質量分析用プレートに転写し、転写

した蛋白質を質量分析することを特徴とする蛋白質の同定方法；  
に関するものである。

本発明のさらなる目的および特徴、並びに本発明の効果は、以下の「発明の実施の形態」においてより明確となるであろう。

#### 【 0 0 1 5 】

##### 【発明の実施の形態】

##### 質量分析用プレート

本発明の質量分析用プレートは、支持体（基本構造）上にポリビニリデンジフロリド（polyvinylidene difluoride；P V D F）の薄層を形成したものである。支持体の素材は、通常質量分析用プレートにおいて使用されているものであれば特に限定されない。例えば、絶縁体（ガラス、セラミクス、プラスチック・樹脂等）、金属（アルミニウム、ステンレス・スチール等）、導電性ポリマー、それらの複合体などが挙げられる。好ましくはアルミニウムプレートを用いる。

#### 【 0 0 1 6 】

本発明の質量分析用プレートの形状は、使用する質量分析装置、そのうち特に試料導入口に適合するように考案される。例えば、電気泳動後のゲルのサイズに合わせた集合型の質量分析用プレートに蛋白質を転写した後に、質量分析装置の試料導入口にフィットするように一本一本が簡単に分離できるようにあらかじめ切れ目を入れたクラスター型質量分析用プレート等が挙げられるが、これに限定されるものではない。

#### 【 0 0 1 7 】

本発明において「P V D Fの薄層」とは、従来公知のP V D F膜のように予め成型された構造体を支持体上に重層するのではなく、P V D F分子が分散した状態で支持体上に堆積されて形成された層をいう。P V D Fが堆積される態様は特に制限されないが、後述の質量分析用プレートの調製方法において例示される手段が好ましく用いられる。

薄層の厚さは、蛋白質の転写効率および質量分析の測定感度等に好ましくない影響を与えない範囲で適宜選択することができるが、例えば、約0.1～約1000  $\mu\text{m}$ 、好ましくは約1～約300  $\mu\text{m}$ である。

## 【0018】

質量分析用プレートの調製方法

本発明の質量分析用プレートは、P V D Fで支持体表面をコーティングすることにより調製される。コーティングの手段としては、塗布、噴霧、蒸着、浸漬、印刷（プリント）、スパッタリングなどが好ましく例示される。

「塗布」する場合、P V D Fを、適当な溶媒、例えば、ジメチルホルムアミド（dimethyl formamide；DMF）などの有機溶媒に適当な濃度（例えば、約1～約100mg/mL程度）で溶解したもの（以下、「P V D F含有溶液」という）を、刷毛などの適当な道具を用いて支持体（基本構造）に塗布することができる。

「噴霧」する場合、上記と同様にして調製したP V D F含有溶液を噴霧器に入れ、支持体上に均一にP V D Fが堆積されるように噴霧すればよい。

「蒸着」する場合、通常の有機薄膜作製用真空蒸着装置を用い、支持体を入れた真空槽中でP V D F（固体でも溶液でもよい）を加熱・気化させることにより、支持体表面上にP V D Fの薄層を形成させることができる。

「浸漬」させる場合、上記と同様にして調製したP V D F含有溶液中に支持体を浸漬させればよい。

「印刷（プリント）」する場合は、支持体の材質に応じて通常使用され得る各種印刷技術を適宜選択して利用することができ、例えば、スクリーン印刷などが好ましく用いられる。

「スパッタリング」する場合は、例えば、真空中に不活性ガス（例、Arガス等）を導入しながら支持体とP V D F間に直流高電圧を印加し、イオン化したガスをP V D Fに衝突させて、はじき飛ばされたP V D F分子を支持体上に堆積させて薄層を形成させることができる。

コーティングは支持体全面に施してもよいし、質量分析に供される一面のみに施してもよい。

## 【0019】

P V D Fはコーティング手段に応じて適宜好ましい形態で 사용할 ことができ、例えば、P V D F含有溶液、P V D F含有蒸気、P V D F固体分子などの形態で支持体にアプライされ得るが、P V D F含有溶液の形態でアプライすることが

好ましい。「アプライする」とは、接触後にP V D Fが支持体上に残留・堆積されるように支持体に接触させることをいう。アプライ量は特に制限はないが、P V D F量として、例えば、約1～約100  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ が挙げられる。アプライ後に溶媒は自然乾燥、真空乾燥などにより除去する。

#### 【0020】

本発明の質量分析用プレートにおける支持体（基本構造）は、P V D Fでコーティングする前に予め適当な物理的、化学的手法により、その表面を修飾（加工）しておいてもよい。具体的には、プレート表面を磨く、傷を付ける、酸処理、アルカリ処理、ガラス処理（テトラメトキシシランなど）等の手法が例示される。

#### 【0021】

本発明の質量分析用プレートは安定性に優れている。すなわち、pH 2～10あるいは各種塩を含む水溶液、メタノール、アセトニトリルなどの溶媒、これらの混合溶媒への浸漬、電気的な負荷、湿潤と乾燥の繰り返し、高度な真空状態、などの条件下であっても接着面は剥がれないという特性を有する。

#### 【0022】

##### 当該プレートの用途

##### A. 蛋白質の同定

本発明の質量分析用プレートを用いて蛋白質を同定することができる。すなわち、蛋白質含有試料を電気泳動（例：ポリアクリルアミドゲル電気泳動）に付して蛋白質を分離し、分離された蛋白質を本発明の質量分析用プレートに転写し、転写された蛋白質を質量分析することにより、（その分子量に関する情報から）蛋白質を同定するものである。

#### 【0023】

##### 蛋白質含有試料

蛋白質含有試料は、公知のいかなる手法によって（生体）材料より調製されてもよい。ここで（生体）材料としては、例えば、動植物や微生物等の、任意の生物の細胞または組織、あるいは細胞外液（例えば、血液、血漿、尿、骨髓液、腹水等）、細胞内液、細胞小顆粒内液などが挙げられる。また、細胞培養液、遺伝

子組換えにより得られる培養液なども含まれる。

#### 【0024】

電気泳動に供される蛋白質含有試料を調製するには公知の方法が用いられる。例えば、標的細胞を入手後、適切な緩衝液中で種々の蛋白質分解酵素阻害剤の存在下にホモゲナイズするか、ポリトロン等の細胞破壊装置で懸濁化するか、低浸透圧ショックにより細胞を破壊するか、超音波処理により細胞膜を破壊した後、遠心分離して上清を採取することにより可溶性画分を得ることができる。また得られた沈殿（不溶性）画分を、界面活性剤や蛋白質変性剤により可溶化して用いることもできる。

#### 【0025】

##### 電気泳動

試料中の蛋白質を電気泳動により分離（ゲル上に展開する）工程である。電気泳動装置は公知のものをを用いることができる。また市販品を用いてもよい。目的に応じて一次元ゲル電気泳動、二次元ゲル電気泳動のどちらも使用することができる。二次元ゲル電気泳動では、一次元の泳動は蛋白質の等電点による分離、二次元の泳動は蛋白質の分子量による分離が基本である。電気泳動に使用されるゲルのサイズは特に制限されない。10cm×10cmが一般的であるが、必要ならば20cm×20cmあるいは他のサイズも使用できる。また、ゲルの素材もポリアクリルアミドが基本であるが、目的によってはアガロースゲル、セルロースアセテート膜等、他の媒体の利用も可能である。ゲルの濃度も均一な濃度あるいはグラジエントな濃度の両方が使用できる。

#### 【0026】

##### 転写

電気泳動により分離した蛋白質を本発明の質量分析用プレートに転写する工程である。転写装置としては公知のものをを用いることができる。また市販品を用いてもよい。転写の方法自体は公知である。泳動後ゲルに展開された蛋白質は、種々の方法（拡散、電気力その他）によって質量分析用プレートに移行される。この工程は一般に転写（blot）と呼ばれる。拡散転写、電気転写などが挙げられる。特に好ましくは電気転写である。

## 【0027】

また、当該転写後に、後の質量分析（MALDI法による）に有利なように、レーザー光を吸収し、エネルギー移動を通じて試料蛋白質分子のイオン化を促進するためにマトリックスと呼ばれる試薬を添加することもできる。当該マトリックスとしては、質量分析において公知のものをを用いることができる。例えば、2, 5-ジヒドロキシ安息香酸（2,5-dihydroxybenzoic acid; DHB）等が挙げられるが、これに限定されない。

## 【0028】

質量分析

本発明の質量分析用プレート上に転写された蛋白質を質量分析することにより、（分子量に関する情報から）蛋白質を同定する工程である。質量分析装置は、ガス状の試料をイオン化した後、その分子や分子断片を電磁場に投入し、その移動状況から質量数／電荷数によって分離、物質のスペクトルを求めることにより、物質の分子量を測定・検出する装置である。試料とレーザー光を吸収するマトリックスを混合、乾燥させて結晶化し、マトリックスからのエネルギー移動によるイオン化とレーザー照射による瞬間加熱により、イオン化した試料を真空中に導くマトリックス支援レーザー脱イオン化（MALDI）と、初期加速による試料分子イオンの飛行時間差で質量数を分析する飛行時間型質量分析（TOFMS）とをあわせて用いるMALDI-TOFMS法、1蛋白質を1液滴にのせて液体から直接電氣的にイオン化する方法、試料溶液を電氣的に大気中にスプレーして、個々の蛋白質多価イオンをunfoldの状態で気相に導くナノエレクトロスプレー質量分析（nano-E SMS）法等の原理に基づく質量分析装置を使用することができる。

本発明の質量分析用プレート上に存在する蛋白質を質量分析する方法自体は公知である。

## 【0029】

また、本発明によるプロテオーム解析の完全自動化のためには、レーザー射出口か、あるいは逆に質量分析用プレートに乗せた架台を一次元または二次元方向へ移動させ、連続全面スキャンすることにより、電気泳動により一次元または二次元に展開された蛋白質を全て分析にかけることが可能となる（断続的なスキャ

ン法では、レーザー光の照射されない、すなわち分析されない蛋白質が残存する)。この方式に断続スキャン法を取り入れれば、96穴プレートに分注された96種のサンプルを一括して質量分析用プレートにマウントし(矩形チップに96種類のサンプルが等間隔で配列する)、そのまま質量分析に供することも可能である。

### 【0030】

#### B. 蛋白質群の同定

本発明によれば、複数種の蛋白質の集合体(蛋白質群)を一度に解析することができる。すなわち、上述の種々の生体材料から調製される蛋白質含有試料は、通常、多種多様な蛋白質を含有している。かかる蛋白質群を一次元もしくは二次元のゲル電気泳動によって分離し、ゲル上に分離・展開された蛋白質群を、例えば、泳動ゲルと適合する大きさの本発明の質量分析用プレート(好ましくは、転写後、質量分析装置の試料導入口にフィットするように一本一本が簡単に分離できるようにあらかじめ切れ目を入れたクラスター型質量分析用プレート)に転写することにより、原則的に蛋白質含有試料中に含まれるすべての蛋白質(すなわち、プロテオーム)を、個別の位置に分画して質量分析用プレート上に転写することができる。これらの蛋白質群を上記の連続スキャン型質量分析装置を用いて測定することにより、転写された蛋白質群を一括して同定することが可能となる。

### 【0031】

#### C. 蛋白質複合体の同定

本発明によれば、蛋白質と当該蛋白質と親和性を有するもの(相互作用を示すもの)の関連性を一度に解析することができる。すなわち、電気泳動により蛋白質を分離し、分離した蛋白質を本発明の質量分析用プレートに転写し、その後に当該蛋白質と親和性を有する(相互作用を示す)化合物を含有する試料(例えば、ペプチド、蛋白質、核酸、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、細胞膜画分、オルガネラ膜画分など)を添加して当該プレート上で複合体を形成させ、形成された複合体を質量分析することにより、(分子量に関する情報から)転写された蛋白質、当該蛋白質と親和性を有する(相互作用を示す)化合物、および/またはそれらの複合体を同定

するものである。

### 【0032】

#### 【実施例】

本発明をより詳細に説明するために以下に実施例を挙げるが、本発明はこれらにより何ら限定されるものではない。

### 【0033】

#### 実施例1：質量分析用プレートの調製

ProteinChip System (Ciphergen社製) の質量分析用プレート導入部に適合するように調製したアルミニウム製の基本構造 (アルミプレート) を1% テトラメトキシシラン/1% 酢酸溶液に浸漬し、風乾した後に焼成 (130℃、3時間) した。このプレートに、ポリビニリデンジフロリド (PVDF) をジメチルホルムアミド (DMF) に10 mg/mLとなるように溶解したものを塗布した。調製された質量分析用プレートは大きさが78 mm×8 mm×2 mm、表面が白色の板状であった。

本質量分析用プレートは、その後の有機溶媒への浸漬による前工程、電気泳動ゲルとの接触、種々の緩衝液中での電気転写、その後のマトリックスの塗布・乾燥及び質量分析時の高度真空下、などの各工程で、亀裂、剥離、損傷、変色等の化学的、電氣的、機械的、物理的変性が一切生じなかった。

本質量分析用プレートを使用して以下の検討を行った。

### 【0034】

#### 実施例2：質量分析用プレートへの蛋白質の電気転写

プレステインド分子量マーカー (Bio-Rad社製) を12% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動した後に、ゲル上の蛋白質を12.5 mM Tris/96 mM グリシン/10% メタノール緩衝液中で、実施例1で調製した質量分析用プレートに対して、90mAで3時間電気転写した。その結果、転写後のポリアクリルアミドゲルには分子量9万と11万のプレステインド蛋白質が若干残存するものの、いずれの蛋白質とも本発明の質量分析用プレートに効率よく転写された (図1)。

### 【0035】

#### 実施例3：質量分析用プレートに転写された蛋白質に対する質量分析

サンプル (蛋白質混合物) を12% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動した



後にゲルを直接、実施例 1 の質量分析用プレートに接触させ、電気泳動で分離された蛋白質を実施例 1 で調製した質量分析用プレートに電気転写させ、本質量分析用プレートを直ちに質量分析装置に導入して測定した。マトリックスとして 2, 5-ジヒドロキシ安息香酸 (DHB、75 mg/mL のエタノール溶液) を用い、測定装置は ProteinChip System (前記) を使用し、Detector voltage 1800 V、Detector Sensitivity 8、Laser Intensity 280 の条件で測定を行った。質量校正はミオグロビン (ウマ筋肉由来)、GAPDH (ウサギ由来)、アルブミン (ウシ血清由来) を用いて外部校正を行った。本実験では蛋白質混合物として、一本鎖尿性プラスミノゲンアクチベータ (single chain urinary plasminogen activator; SCUPA) とヒト血清アルブミン (human serum albumin; HSA) の二種類の蛋白質を使用し、12% SDS-ポリアクリルアミドゲルに各 4  $\mu$ g の蛋白質混合物を還元下でタンデムに 2 回電気泳動した。すなわち、初回サンプルを添加し、30 mA で 40 分間電気泳動した後、電流を一旦止め、2 回目に同じレーンに同じサンプルを添加し、さらに 30 mA で 23 分間電気泳動した。泳動後、ゲルを泳動レーンごとにカットし、さらにゲル上面の添加位置から 39 mm の位置でカットし、二枚の泳動ゲルの上面同士が接触するように並べた後に、質量分析用プレートを接触させた (図 2)。この時、泳動サンプルは SCUPA、HSA、SCUPA、HSA、HSA、SCUPA、HSA、SCUPA の順序に配列し、質量分析用プレートには各蛋白質が 4 バンド、合計 8 バンド転写された。

### 【 0 0 3 6 】

使用した質量分析装置は、一本の質量分析用プレートに対してレーザー光が連続的に照射されず、24 個所にわたって等間隔で照射されるために、転写された蛋白質の質量分析用プレート上の位置によっては、レーザー光が全く当たらない場合、一部分当たる場合、完全に当たる場合が想定される。このような分析装置の制約の下でレーザー光が最も多量に当たりピーク強度が最も高くなる確率を向上させるために、先に述べた手法で各モデル蛋白質を質量分析用プレートの異なる位置にそれぞれ 4 箇所転写させるように工夫した。その結果、理論的には同じ質量の蛋白質が転写されても、質量分析の結果得られたピークの高さは様々であった (図 3)。したがって、本実験では、得られた複数のピークの中で相対強度の最

も高いピークをレーザー光が完全に当たった真の値に最も近い値とみなして考察を行った。

#### 【0037】

質量分析用プレートは事前にメタノールに浸漬した後、転写用緩衝液（10 mM ホウ酸ナトリウム緩衝液、pH 8.0）で平衡化した後に、90 mAで2時間電気転写を行った。さらに質量分析して相対ピーク強度を測定した。比較対照として、PVDFをコートしない通常のアルミプレート、ヘキサデシル基を導入したアルミプレート（ProteinChip array、Ciphergen社製、H4）も用いて同様の実験を行った。結果を図3、図4に示す。

SCUPAの場合、本発明の質量分析用プレートでの相対ピーク強度は12.31で、通常のアルミプレートの値（0.87）の14倍高いものであった。HSAについて同様に比較すると、本質量分析用プレートでの相対ピーク強度はアルミプレートに比較して49倍（6.26：0.129）高いものであった（図3）。また、質量分析用プレートはH4と比較しても2倍から4倍相対ピーク強度が高いものであった（同図）。さらに、本発明の質量分析用プレートはアルミプレートに比較してスペクトルが鮮明であった（図4）。これらの結果から、本発明の質量分析用プレートを用いることにより、複数種の蛋白質を電気泳動で分離した後、迅速かつ高感度に一括して質量分析できることが判明した。

#### 【0038】

実施例4：電気泳動分離後の電気転写蛋白質と結合蛋白質の相互作用の解析

本発明の質量分析用プレートを用いた応用例の一つとして、質量分析用プレートに転写された蛋白質と相互作用しうる蛋白質との結合およびその後の質量分析によるそれら蛋白質複合体の同定を検討した。材料（マテリアル）としてSCUPAとその抗体（抗SCUPA抗体）を用いた。

#### 【0039】

SCUPA（4  $\mu$ g）を12% SDS-ポリアクリルアミドゲルに添加後、1時間電気泳動した。泳動後にゲルをカットし、ゲル上のSCUPAを実施例1で調製した質量分析用プレートに実施例3と同様に電気転写した。SCUPAが転写された質量分析用プレートをブロッキング後、抗血清（硫酸により粗精製したもの、抗SCUPA抗体を

含んでいる)を添加し、一晚反応させた。反応終了後、プレートをPBS緩衝液で洗浄し、マトリックスを添加して、質量分析を行った。その結果を図5に示す。

電気泳動後の質量分析用プレートに転写されたSCUPAは48,616にピークが現れ、同プレート上に固定されたSCUPAと相互作用した抗SCUPA抗体のピークは145,300(73,115は同抗体の2価イオン)に認められた(図5のA)。また、コントロールとしてSCUPAを含まないゲルでは、電気転写、ブロッキング、抗SCUPA抗体添加、PBS洗浄等、同様の操作を行ったにもかかわらず、本質量分析用プレートには一切ピークが観察されなかった(図5のB)。

以上の結果から、電気泳動分離後、本質量分析用プレートに転写されたSCUPAは、自身と相互作用しうる蛋白質との結合活性を保持したこと、及び転写蛋白質とそれと相互作用する蛋白質の双方の分子量が実際に一括して測定され、その結果、両分子が同定されたことから、本質量分析用プレート上で蛋白質-蛋白質複合体の検出と、本質量分析用プレート上で生成された複合体の同定が可能であることが証明された。

#### 【 0 0 4 0 】

##### 比較例1：PVDF膜への転写と質量分析

12% SDS-ポリアクリルアミドゲルにSCUPAとHSAの二種類の蛋白質各4  $\mu$ gの混合物を還元下でタンデムに2回電気泳動した。初回サンプルを添加し、30 mAで40分間電気泳動した後、電流を一旦止め、2回目に同じレーンに同じサンプルを添加し、さらに30 mAで23分間電気泳動した。泳動後ゲルを泳動レーンごとにカットし、さらにゲル上面の添加位置から39 mmの位置でカットし、図2に示すように二枚の泳動ゲルの上面同士が接触するように並べたゲル上に、78 mm×8 mmにカットしたPVDF膜を載せ、10mMホウ酸ナトリウム緩衝液(pH 8.0)中で90 mA、2時間電気転写した。転写終了後、PVDF膜をPBSで洗浄し、蒸留水でリンス、乾燥させ、さらに透明両面テープ(住友スリーエム社製)でアルミプレートに貼り付けた。これにマトリックス(DHB)を添加してProteinChip System(前記)で質量分析を行った。

その結果、PVDF膜に転写されたSCUPAは50,096.9に、HSAは67,394.5に、各々ピークが現れたが、相対ピーク強度が極めて低く、さらにS/N比も低いためピーク

の同定が困難であった（図 6）。また、通常の質量分析用プレート（本発明の質量分析用プレートも同様であるが）では高度真空状態に到達する時間が2～3分で、その後すぐに測定可能となるのに対して、PVDF膜を使用した場合は、真空状態に到達する時間が45分もかかり、使用した質量分析装置に過大な負荷をかけ、頻繁な使用に耐えられないことが判明した。

#### 【 0 0 4 1 】

##### 【発明の効果】

本発明の質量分析用プレートは、リガンド吸着素材としてPVDFを用いたことにより、各種の蛋白質を均等に吸着でき、転写効率に優れ、蛋白質の三次元構造・機能を正常に保持することが可能となる。また、非特異吸着が起らない、転写後瞬時に質量分析を行うことができるなどの特徴を有する。

本発明の質量分析用プレートのこのような特徴を活かして、多量、迅速かつ高感度に蛋白質を分析・同定することができる。蛋白質は1種でもよく、複数種の集合体（蛋白質群）でもよく、また、当該蛋白質と親和性を有する（相互作用を示す）化合物との複合体であっても同様に（つまり、多量、迅速かつ高感度に）分析・同定することができる。

また、操作時間の大幅な短縮化と工程の簡略化、装置の小型化、低廉化、自動化、大量の検体処理が可能となり、大規模なプロテオーム解析が容易になる。さらに、生理的に重要な微量蛋白質のプロテオーム解析が可能となり、診断用のバイオマーカーの発見、新規な医薬品開発のシードの発見に貢献できる。

従って本発明は、電気泳動法と質量分析法を組合せた従来のプロテオーム解析に新たな手法を導入することを可能とするものである。

##### 【図面の簡単な説明】

##### 【図 1】

泳動ゲルから質量分析用プレートへの電気転写の度合いを示す写真である。Aは泳動ゲル（転写前）、Bは泳動ゲル（転写後）、Cは本発明の質量分析用プレート（転写後）を示す。左端の数字はバンドに対応する蛋白質の分子量を表す。電気転写によって蛋白質の種類によってはゲル中のほぼ全量が新規の質量分析用プレートへ移行することを示す。

**【図 2】**

泳動ゲルと質量分析用プレートの位置関係（左図） およびプレート上の転写蛋白質が受けるレーザー光量の差異（右図）を示す図である。Aは光量最大、Bは光量小、Cは光量ゼロ、の場合を各々示す。

**【図 3】**

本発明の質量分析用プレート（左図）、アルミプレート（中図）、ProteinChip array（H4、右図）を用いたときの質量分析ピークの相対強度を示す図である。

**【図 4】**

本発明の質量分析用プレートまたはアルミプレートを用いて得られるSCUPAとHSAの質量分析スペクトル（ピーク像）を示す図である。横軸は分子量、縦軸は相対強度を示す。上の2図はSCUPAを、下の2図はHSAを、各々示す。また左の2図は本発明の質量分析用プレートを、右の2図はアルミプレートを、各々示す。

**【図 5】**

本発明の質量分析用プレートを用いて電気転写した蛋白質（SCUPA）とそれに特異的に反応する抗体（抗SCUPA抗体）との蛋白質－蛋白質相互作用を質量分析法により解析した結果を示す図である。横軸は分子量、縦軸は相対強度を示す。図中の数字はピークの分子量を示す。また上図（A）は分離・転写されたSCUPAと抗SCUPA抗体の相互作用を示す。また、下図（B）は抗SCUPA抗体を単独で用いた場合の結果を示す。

**【図 6】**

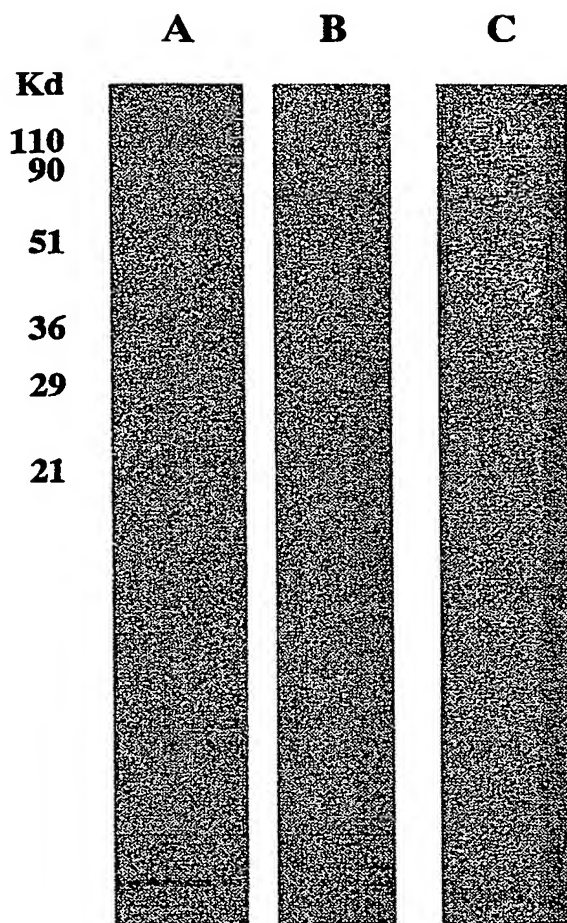
電気泳動により分離した蛋白質をPVDF膜に転写した場合の質量分析スペクトルを示す図である。横軸は分子量、縦軸は相対強度を示す。図中の数字はピークの分子量を示す。上図はSCUPAを、下図はHSAを、各々示す。

**【符号の説明】**

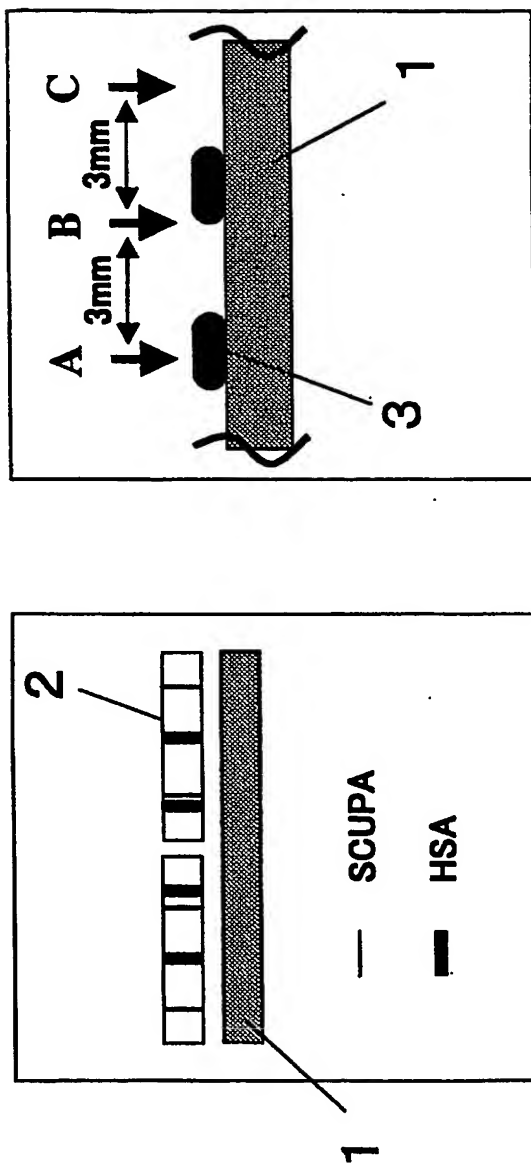
- 1：質量分析用プレート
- 2：泳動ゲル
- 3：蛋白質

【書類名】 図面

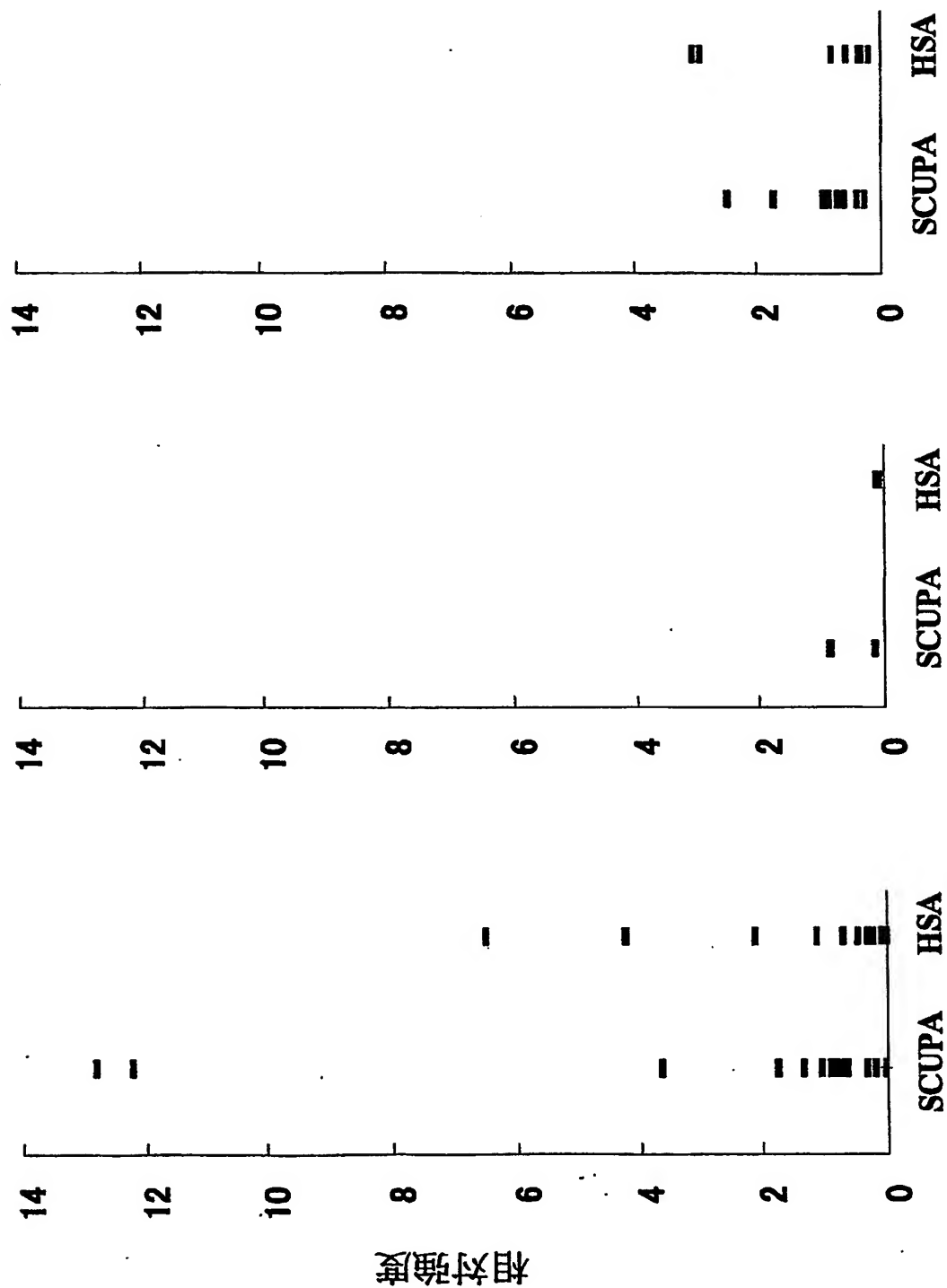
【図 1】



【図2】

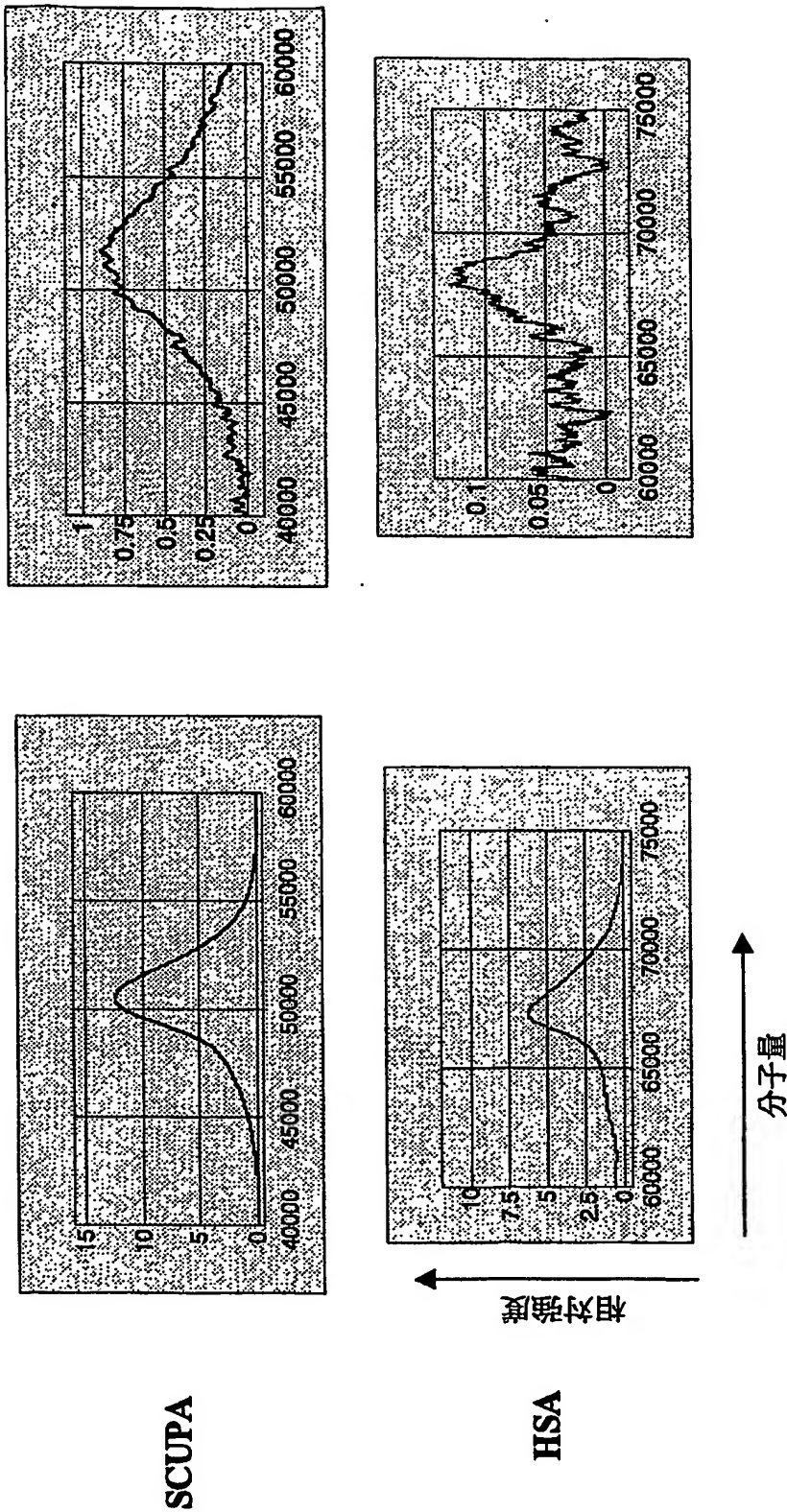


【図 3】

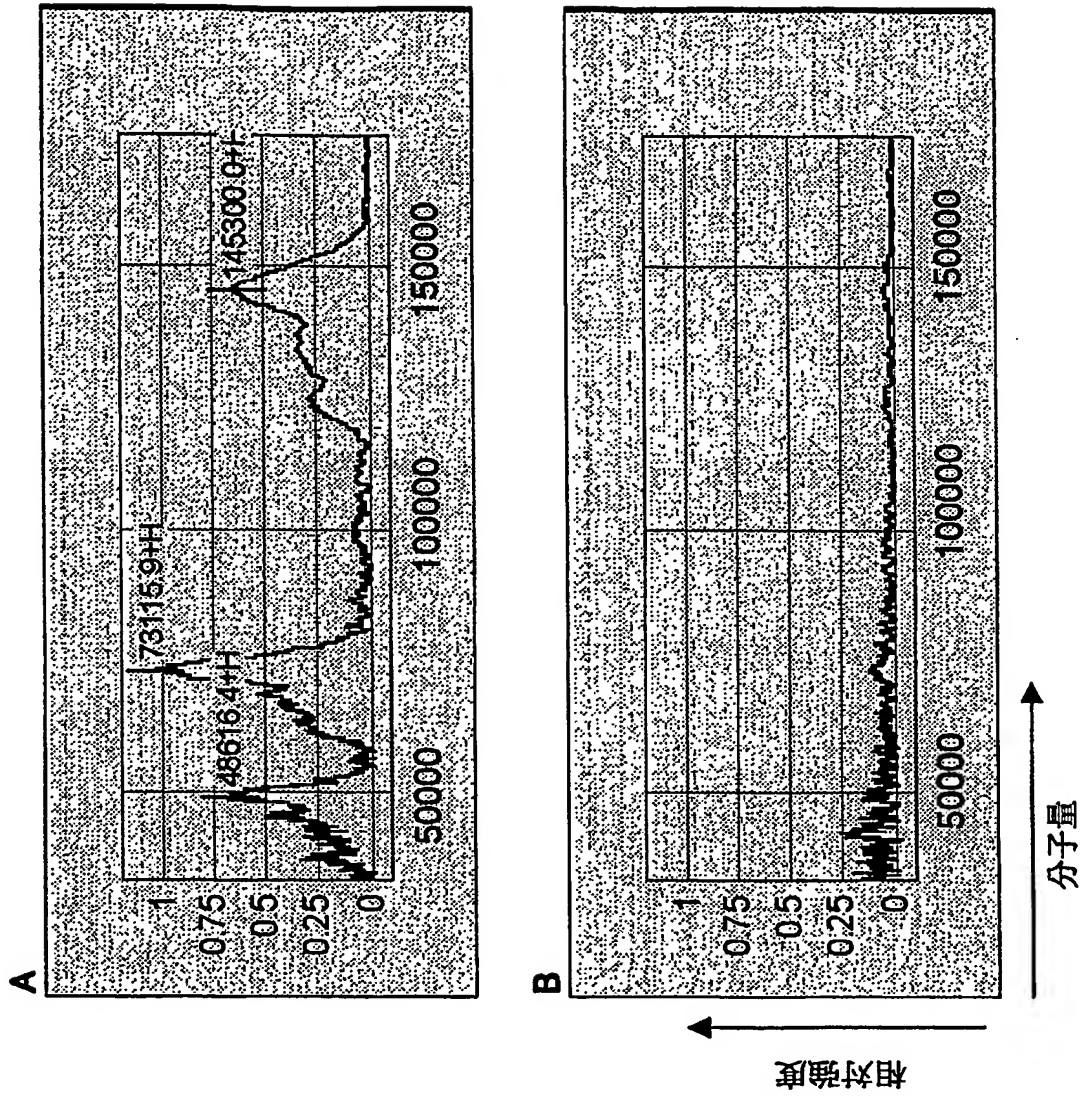




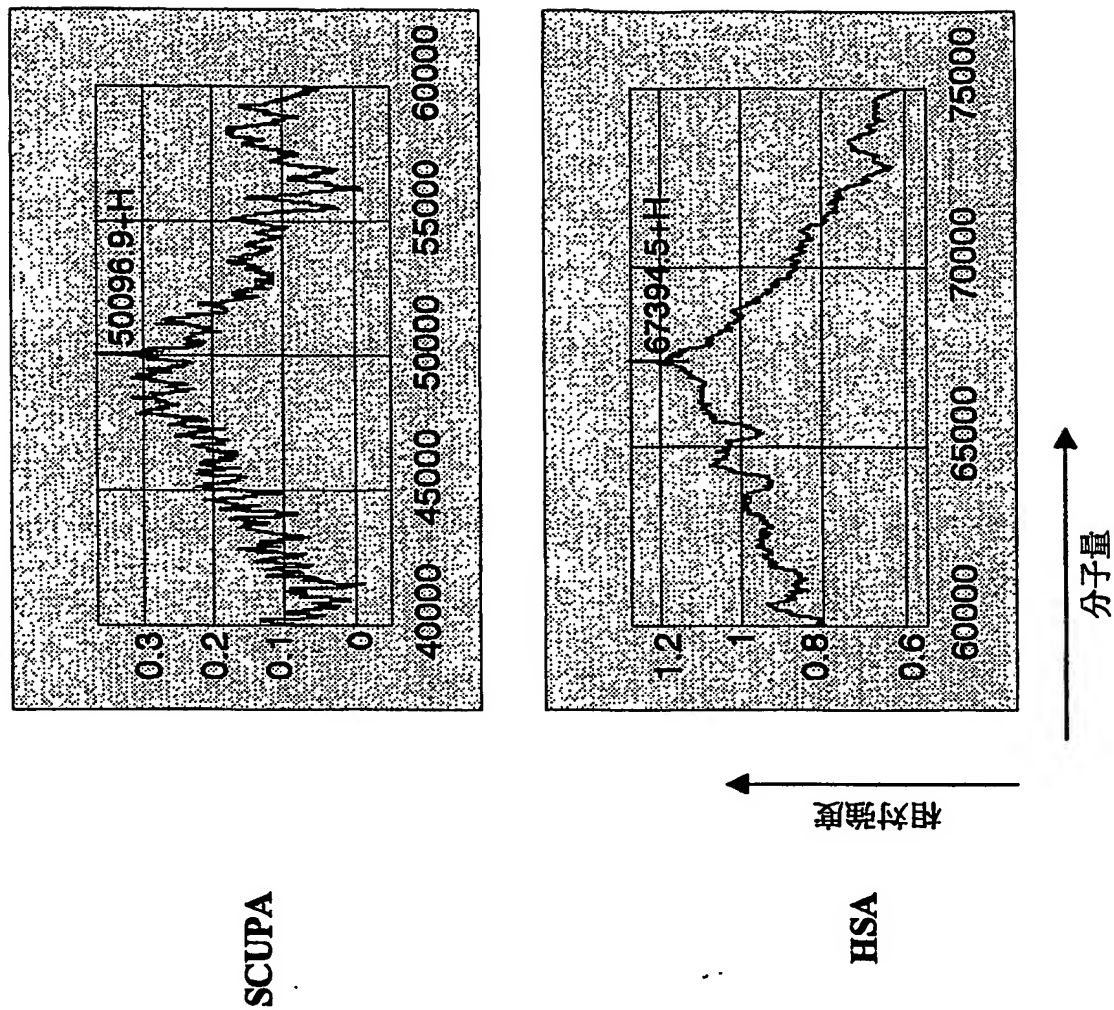
【図 4】



【図 5】



【図 6】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 電気泳動法と質量分析法の組合せ技術によるプロテオーム解析法において、解析を多量、迅速かつ高感度を実施するための新規技術の提供。

【解決手段】 支持体上にP V D Fの堆積した薄層を有してなる質量分析用プレート、P V D Fで支持体表面をコーティングすることを特徴とする質量分析用プレートの調製方法、蛋白質含有試料を電気泳動して蛋白質を分離し、分離した蛋白質を前記質量分析用プレートに転写し、転写した蛋白質を質量分析することを特徴とする蛋白質の同定方法。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 2 - 3 4 4 7 1 0

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 0 0 0 0 0 6 7 2 5 ]

1. 変更年月日

2 0 0 1 年 1 0 月 1 日

[変更理由]

住所変更

住 所

大阪府大阪市中央区平野町 2 丁目 6 番 9 号

氏 名

三菱ウェルファーマ株式会社